法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-09-01

有胞子細菌のDNA再編成の多様性

吉成, 輝 / YOSHINARI, Akira

(出版者 / Publisher)
法政大学大学院理工学・工学研究科
(雑誌名 / Journal or Publication Title)
法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編
(巻 / Volume)
55
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
2
(発行年 / Year)
2014-03-24
(URL)
https://doi.org/10.15002/00010397

有胞子細菌の DNA 再編成の多様性

DIVERSITY OF DNA REARRANGEMENT IN SPORE-FORMING BACTERA

吉成輝
Akira YOSHINARI
指導教員　佐藤勉

法政大学大学院工学研究科生命機能学専攻修士課程

In *Bacillus subtilis* the σ^K-encoding gene, *sigK*, is disrupted by phage-like *skin* (*sigK* intervening) element thereby splitting the gene into two protein coding sequences, 5'-end of *sigK* and 3'-end of *sigK* during sporulation. A site-specific DNA recombinase promotes excision of *skin* from the chromosome and the joining in frame of two partial genes to reconstitute a functional *sigK* gene. A search of microbial genome databases showed that various bacterial genes, including sporulation-related homologous genes were disrupted by phage-like elements in spore-forming bacteria. In this study, I found that *Geobacillus thermoglucosidasius spoVR*, *B. vallismortis spoVK*, *B.cereus gerE* were a composite coding sequence generated via chromosomal rearrangement that excised prophage-like elements. These results suggested that DNA rearrangement via prophage-like element is a common phenomenon in spore-forming bacteria.

Key Words *: DNA rearrangement, prophage, sporulation*

１．緒言

枯草菌 *Bacillus subtilis* は栄養枯渇などのシグナルを受け取ると胞子を形成する。この胞子形成期において、細胞は、将来胞子となるフォアスポアと胞子の成熟に関わる母細胞とに分化する。胞子形成は、それぞれの細胞内で異なる σ 因子による遺伝子発現が時間的・空間的な制御を受けることで進行する。σ^Kをコードする *sigK* は栄養細胞ではファージ由来と考えられる配列によって分断されている。ところが、胞子形成期後期にこの配列は内部にコードされている部位特異的組換え酵素の働きによって切り出され､完全な *sigK* が構築される[1, 2, 3]（図１）。この様な DNA 再編成の例は、*Bacillus weihenstephanensis* の *spoVFB* においても確認された[4]。本研究は、有胞子細菌の母細胞特異的遺伝子がファージ DNA 挿入の標的となり分断され、その後の胞子形成に伴う遺伝子再構築の機構を獲得した可能性、さらに、このようなファージ様配列を介した遺伝子再編成が普遍的な現象なのではないかという推測を検討することを目的とした。このため有胞子細菌のゲノム中から、ファージ様配列によって分断された遺伝子を持つ菌種を検索し、その再編成を検出することでこの推測を検証することを試みた。

２．実験方法

（１）プロファージ標的遺伝子の抽出

枯草菌の母細胞特異的に発現することが確認されている 337 遺伝子(σ^E 制御→262、σ^K 制御→75)の公共データベース上のオルソログを調べ、ファージ様配列により分断されているものを抽出した。さらに、この介在配列の中に部位特異的組換え酵素がコードされているか、また、部位特異的組換え酵素が認識すると考えられる逆向き反復配列が存在するか確認した。

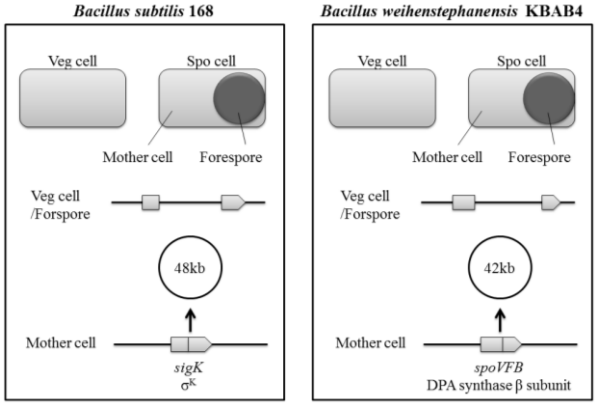

図１　*B. subtilis* と *B. weihenstephanensis* の DNA 再編成

（２）有胞子細菌株の胞子形成能の確認

DNA 再編成の機能を持つと考えられた有胞子細菌候補株の時間経過に伴う胞子形成の進行状況を位相差顕微鏡によって確認し、最適な培養条件を検討した。培養には *Bacillus* 属で一般に胞子形成培地として用いられている DS 培地、MS 培地等を用いた。

（３）DNA 再編成の検出

栄養増殖から胞子形成までの各段階で培養細胞を得た後、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA に対し、介在配列により分断されている遺伝子の配列に対するプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、再編成の有無を調べた。また、再編成後の遺伝子配列に対してシーケンスを行い、再編成後の塩基配列を確認した。

３．実験結果と考察

（１）プロファージ様配列により分断されている遺伝子

ゲノムデータベースを用いた検索により、18 の細菌種で *spoVR, spoVK, cotJC, gerE* など新たに 10 種類の胞子形成遺伝子がファージ様配列により分断されていることが確認された（図２）。これらの中には介在配列内に３つの部位特異的組換え酵素がコードされている株も確認された。これらの有胞子細菌株のうち、生育環境の異なる非病原性の 3 株、*Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93、*Bacillus vallismortis* DV1-F-3、*B. cereus* ATCC10987 を以後の解析対象とした。

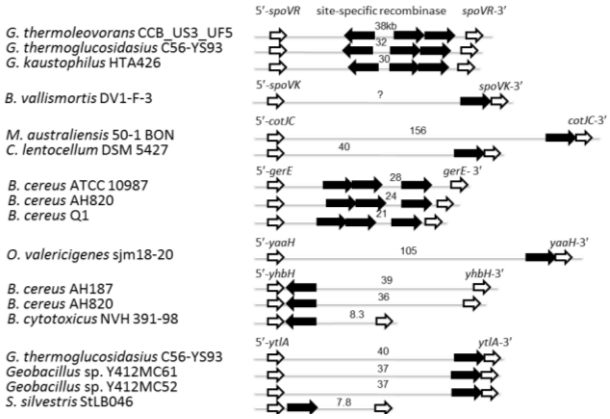

図２　新たに見出された介在配列により分断されている遺伝子（一部）

（２）胞子形成能の確認

胞子形成培地に DS 培地を用い、培養温度を *G. thermoglucosidasius* 60℃、*B. vallismortis* 37℃、*B. cereus* 30℃でそれぞれ培養したところ、*G. thermoglucosidasius* と *B. vallismortis* は培養開始から 7 時間、*B. cereus* は培養開始から 12 時間ほどで細胞内に胞子が観察された(図３)。

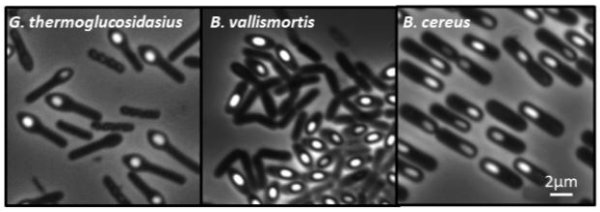

図３　胞子形成後期の各菌種の位相差顕微鏡写真

（３）有胞子細菌の DNA 再編成

次に、胞子形成の各時期の細胞から抽出したゲノム DNA に対し、サザンハイブリダイゼーションを行った。分断された遺伝子周辺の断片を検出した結果、*G. thermoglucosidasius* と *B. vallismortis* は胞子形成開始後約 2 時間、*B. cereus* は胞子形成開始後約 5 時間から分断遺伝子内のファージ様配列が切り出されたことによる新たなバンドが検出された（図４）。また、シーケンス解析の結果、再構築された遺伝子はアミノ酸配列のフレームシフト等を起こしていない完全な遺伝子配列であることが分かった。このことから、分断されていた遺伝子が胞子形成過程で再構築されることが明らかとなった。

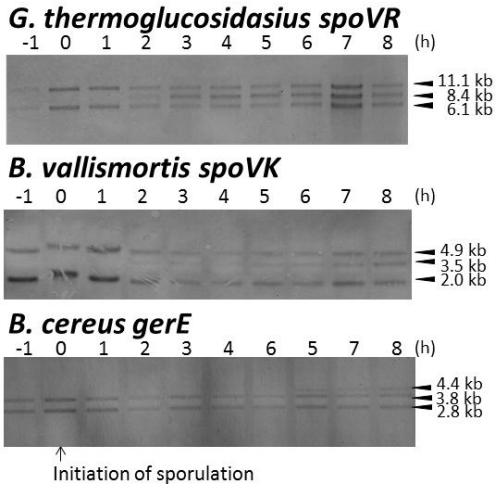

図４　胞子形成期の遺伝子再編成の確認

４．結言

新たに 3 菌種で 3 種類の胞子形成遺伝子の再編成が示された。このことから、枯草菌以外の多くの有胞子細菌においても DNA 再編成による遺伝子再構築システムを有しており、この機構が普遍的に存在することが示唆された。一方、このシステムを持つ有胞子細菌の生育環境は異なり、さらに標的となった遺伝子に関しては多様性があることが分かった。このことから、母細胞特異的に発現する遺伝子においてはファージ様配列を介した DNA 再編成のシステムを獲得しうることが推測された。

参考文献

1）Stragier, P., Kunkel, B., Kloos. L., Losick, R., (1989), *Science*. 243, 507-512.

2）Sato, T., Samori, Y., Kobayashi, Y., (1990), *J.Bacteriol*. 172, 1092-1098.

3）Kimura, T., Amaya, Y., Kobayashi, K., Sato, T., (2010), *J. Bacteriol*. 192, 6209-6216.

4）Abe, K., Yoshinari, A., Aoyagi, T., Hirota, Y., Iwamoto, K., Sato, T., (2013), *Mol Microbiol*. 90, 415-427.